

糖鎖型ガンワクチンの開発：T_N抗原・T抗原糖鎖プローブの効率的合成

Development of carbohydrate type cancer vaccine : efficient synthesis of T_N and T antigen probes

山口 真 範 内 芝 夏 美
Masanori YAMAGUCHI* Natumi UCHISHIBA
(和歌山大学教育学部化学教室)

2011年7月22日受理

Abstract

An effective synthesis method of the T_N and T antigen probes that was the carbohydrate antigen related to cancer was developed.

These synthetic probes will pay important role in the development of the cancer vaccine and the research of cancer.

はじめに

高度な生命活動を営む真核生物の細胞表面には糖鎖が発現されている。糖鎖はそれが存在する細胞の種類によって構造や構成糖がそれぞれ異なっており、その構造多様性を用いて高次生命機能の制御、細胞識別、分化、免疫系の制御などを司っている。また生体にとって負の要因であるガン化、病原菌やウイルスの感染も糖がその現象を仲介しており、適切に糖鎖を制御することは生物の恒常性の維持にとって非常に重要なことである^{1)~4)}。

ガンは、生体内にある細胞が突然変異・遺伝子異常・ウイルス感染・紫外線等によって自己を正常に保つ能力を失った結果、細胞が異常増殖し続け、塊となり周囲の正常細胞を侵食し、本来の機能を失わせる重篤な疾患である。

正常細胞からガン細胞に変化する際に、その細胞表面に発現されている糖鎖も同様に変化し、ガン細胞特有の糖鎖に改変することが知られている⁵⁾⁶⁾。これらのガン細胞特有の糖鎖は、ガンが進行すると切り離され、血液中にも放出されるようになる。臨床において、これらは糖鎖腫瘍マーカーと呼ばれ、これらを認知することでガンの診断に利用されている。この様に糖鎖は細胞のガン化に深く関わっている。

ガンワクチン治療

人間の体内では常にガン細胞が形成されており、健康な人でも毎日3000~4000個ほどのガン細胞の芽が形成されると考えられている。これを免疫細胞が非自己として認識し、攻撃して駆除することで普段は細胞のガン化を防いでいる。しかし、自己の免疫系統が低下した場合や処理能力を超える異常増殖をした場合はガ

ン細胞を駆除することができず、ガン細胞の増殖を許しガン化してしまう。

そこで、一つのガン予防の戦略として糖鎖を利用したガンワクチン治療法が提唱されている。それはガン細胞表面に特異的に発現されている糖鎖を化学的に高純度かつ大量に合成し、ワクチンとして体に投与するものである。このように、合成糖鎖を用いた糖鎖ワクチンにて体をあらかじめ感作しておくことにより、ガン細胞をより効率的に自己免疫系を用いて排除することが可能となる(図1)。

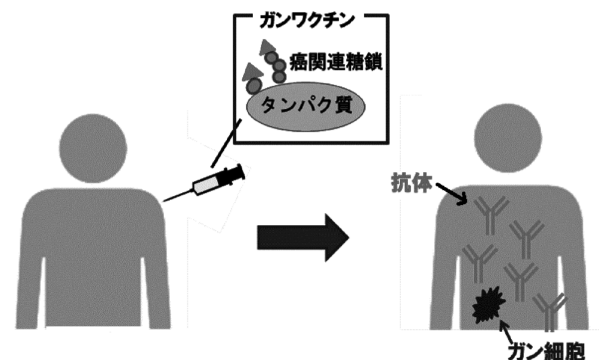


図1 ガンワクチン構想

ンワクチン治療を開発するにあたって、これらのガン関連糖鎖抗原は医療行為に応用するにあたり、大量に必要である。しかし、これらのガン関連糖鎖は生体抽出が困難であり、十分量得ることができない。よって、ガンのワクチン治療において、このガン関連糖鎖を正確で効率的かつ大量に生産できるようになることが必須であり、ガン免疫治療開発において非常に大きなウエイトを占めている。

本研究ではガン化した細胞表面に発現している糖鎖の中でも最も基本的かつ単純である T_N 抗原とT抗原糖鎖の2種類を有機化学的に効率的に合成し、ガン治療に貢献することを目指すものである。

合成を目指した T_N 抗原は、ガン関連糖鎖抗原のなかでは最も単純な構造をとり、その構造はセリンやスレオニンの側鎖にN-アセチルガラクトサミンという種類の糖が α 結合したO-結合型糖鎖である⁷⁻¹³⁾。 T_N 抗原は白血病・リンパ腫瘍・甲状腺ガンなどに多く発現している。

次に、この T_N 抗原を構成するN-アセチルガラクトサミンの3位水酸基にガラクトースが β 結合したものが、T抗原であり、膵臓ガン、乳ガン、大腸ガンなどに発現していることが知られている⁷⁾。(図2)

T_N 抗原プローブの合成

ガラクトサミン塩酸塩である、化合物1を1Mの炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、クロロギ酸2, 2, 2-トリクロエチル (TrocCl) を作用させ、化合物1の

2位のアミノ基をTroc基にて保護した。次いで1, 3, 4, 6位の水酸基をアセチル化し、2段階98%の収率にて化合物2を得た。化合物2の1位をベンジル化し、 $\alpha\beta$ 体混合物としてベンジル体を得、精製後、目的とする α 体である化合物3を30%の収率で得た。次いで亜鉛による2位のTroc基の脱保護、アセチル化を行い化合物4へと導き、すべての保護基をアルカリ条件にて脱保護することにより、定量的に目的とした T_N 抗原プローブである化合物5の合成を達成した。(scheme 1)

T抗原プローブの合成

◆合成戦略

目的化合物の合成にあたり、すべての過程を有機合成のみにより合成するのではなく、グリコシダーゼ(β -ガラクトシダーゼ; E. coli由来)の逆反応である糖転移活性を用いた酵素合成をその合成過程に取り入れ、効率的に合成することを目指した。

酵素合成を利用する部分は、先に合成を達成した T_N 抗原プローブ5 (acceptor)へPNP-ガラクトース

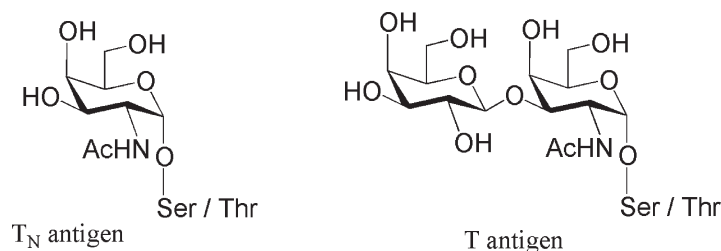
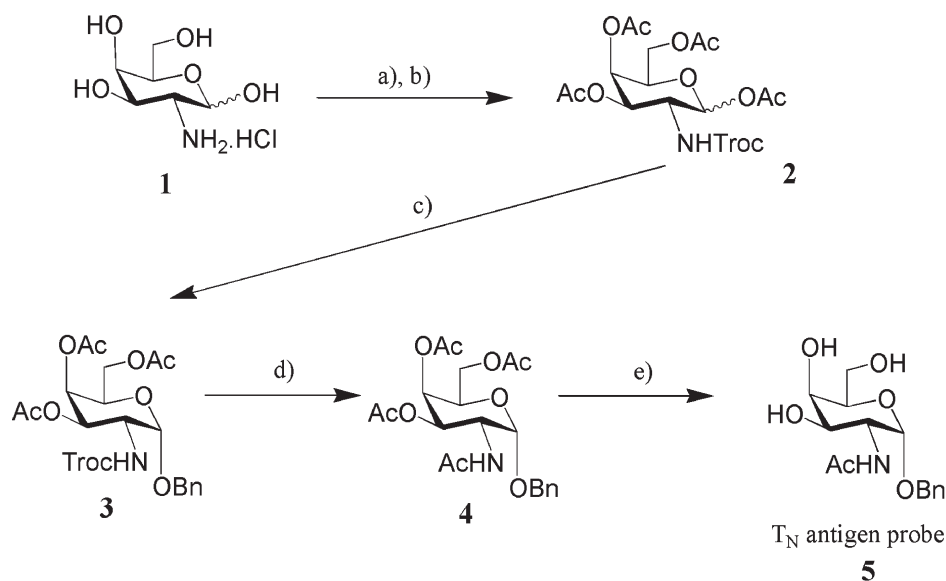


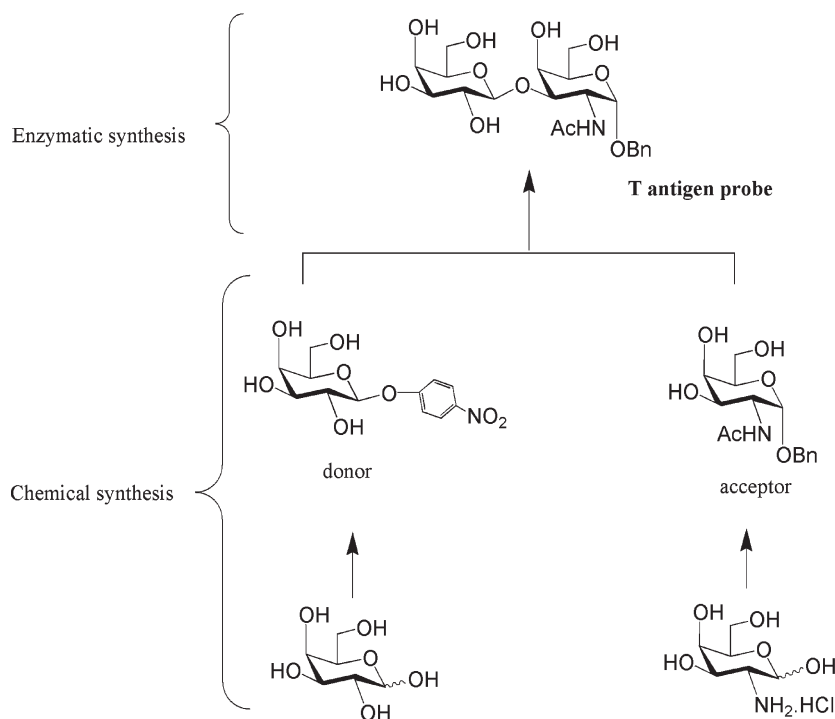
図2 ガン関連糖抗原構造



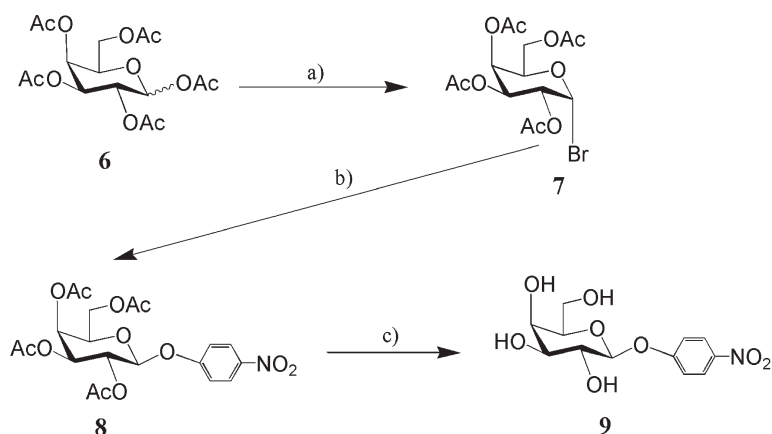
a) TrocCl, 1 M NaHCO₃, r.t., b) Ac₂O, Pyr., r.t., 2 steps, 98.3 %.

c) BnOH, BF₃·OEt₂, r.t., 30 %, d) Zn powder, AcOH, 60°C, then MeOH, Ac₂O, Pyr., r.t., 2 steps, 92 %, e) NaOMe, MeOH, r.t., quant.

scheme 1 chemical synthesis of T_N antigen probe



scheme 2 synthetic strategy of T antigen probe



a) HBr, CH₂CH₂, r.t., b) *p*-nitrophenol, TBAHS, 1 M NaOH, CH₂CH₂, r.t., 2 steps, 74.2 %.
c) NaOMe, MeOH, r.t., quant.

scheme 3 synthesis of PNP-galactose

(donor)を酵素の基質として用い、ガラクトースを導入する際に行うことにした。そのことにより、有機合成時には必須のグリコシレーション時における糖鎖水酸基の官能基変換ステップを大幅に減じ、ダイレクトにT抗原プローブを得ることが可能となり、より効率的な合成方法が確立できる。(scheme 2)

◆PNP-ガラクトースの合成

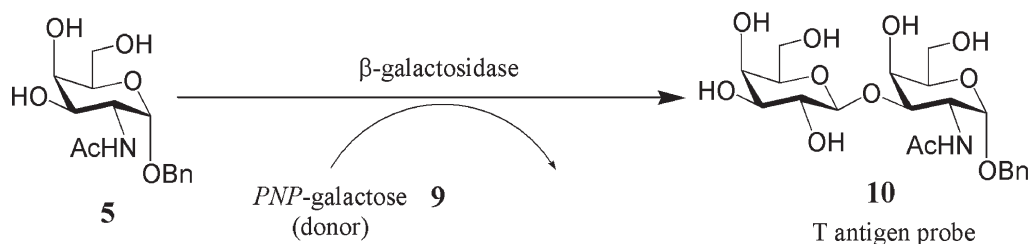
アセチル化ガラクトース 6 を臭化水素酢酸溶液を用い 1 位をブロモ化することにより化合物 7 へ導いた。次に、1 位にパラニトロフェニル基を導入し化合物 8

を得、すべての保護基を脱保護することにより、目的とした化合物 9¹⁴⁾を合成した。(scheme 3)

◆T抗原の酵素合成とその最適糖転移条件の検討

先に合成した化合物 5 (T_N抗原プローブ) を acceptor とし、化合物 9 (PNP-ガラクトース) を donor とし、β-ガラクトシダーゼによる糖転移反応を利用することにより T 抗原の合成を行うことにした。(scheme 4)

最初に、β-ガラクトシダーゼの逆反応である糖転移



scheme 4 enzymatic synthesis of T antigen probe

活性が最大となる至適pHを求めた。pH = 3.5~5.0の領域では、donorであるPNP-ガラクトース9をほとんど分解せず、酵素の働きは抑えられていた。ついでpH = 5.0~7.5の領域では、反応時間は1時間、温度は37℃、pH = 5.6の条件の時に最も目的としたT抗原プローブ10を与えた。またその目的物は、1時間以上の時間の経過、pHの上昇と共に減じられていく傾向を示した。更に、pH = 8以上の領域ではドナーはまったく分解せず、酵素はその働きを失っているという結果が得られた。よって本酵素の糖転移における至適反応条件は、pH = 5.6、反応時間は1時間、温度は37℃であると導き出した。この条件にて基質量、酵素量を検討し、T抗原合成に最適な基質と酵素量を明らかにすることにした。

まずacceptor、donor、酵素それぞれの最適濃度と量を調べるため、次の検討実験を行った。

化合物5 (acceptor)の濃度と酵素量を一定にし、それに対して化合物9 (donor)の濃度を変化させ、目的とした二糖が最も検出される条件を調査した。検出はTLC、LC-MSにて行い、二糖の生成比較はHPLC分析における目的化合物のピーク面積によった。(表1)

	①	②	③	④	⑤
acceptor (μ mol)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
donor (μ mol)	0.11	0.34	0.46	0.57	0.68
結果	++	+++	+	+	-

すべての条件にて β -ガラクトシダーゼ(0.6 Unit)を使用

表1 donor量、acceptor量の検討

次に、上記の実験で得たデータを基に、酵素の最適量(Unit)を調査した。最も目的化合物が得られた②の条件を基本とし、 β -ガラクトシダーゼの量を変化させ、二糖が最も生成される条件を調査した。その結果、⑧の条件にて最も目的化合物を得ることが出来た。(表2)

	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪
β -ガラクトシダーゼ(Unit)	0.15	0.3	0.6	1.2	2.4
結果	++	+++	++	+	-

表2 酵素量の検討

以上より求めた糖転移の至適条件にて、目的としたT抗原プローブ10の合成を達成した。

まとめ

本研究では、ガン関連糖鎖抗原の中で基本的な構造である T_N 抗原・T抗原の効果的合成法の開発を行った。有機化学的手法-酵素化学的手法の双方を組み合わせ、より効率的かつ簡便な合成法を開発した。有機合成により得た T_N 抗原プローブをacceptorとし、PNP-ガラクトースをdonorとして用いたT抗原糖鎖の酵素合成における最適条件を見出し、合成を達成した。これらの合成糖は前述したとおり、各種ガン細胞に発現されているものであり、それらのガンワクチンをはじめとしたガンの治療、研究において重要な役割を果たすことができる。

また本研究において合成を達成したガン関連糖鎖抗原は、各種ガン細胞に発現されている糖鎖の共通構造となっている場合が多い。例えば、シアル酸をシアリダーゼを用いた転移反応を利用し¹⁵⁾、合成した T_N 抗原プローブ、T抗原プローブにそれぞれ導入することにより、卵巣ガン、胃ガン、消化器系のガンにて発現されている ST_N 抗原プローブ、2,6 ST抗原プローブへそれぞれ導くことが可能である。すなわち将来的には種々のガン治療に対応できることが見込める。

実験の部

一般操作

β -ガラクトシダーゼは東洋紡績株式会社製、有機試薬、反応溶媒、カラム溶媒は和光純薬工業株式会社製のものを使用した。TLCはsilica gel 60F254 (merck, alminumsheets)を用い、検出は発色試薬(10% H_2SO_4 -EtOH)によった。高速液体クロマトグラフィー分析及び、分子量の測定は島津製作所製SPD-M20A及びそれに連結したLCMS-2020を使用し、イオン源はESIを使用した。また分析時、使用したカラムは東ソー株式会社製ODS-100V (4.6×150 mm)を使用し、流速は1.0 mL/min、溶離液A: 水、溶離液B: メタノールを用い、リニアグラジェント; B 20%→50%, 30 minにて行った。プロトンNMRは日本電子400 Hzを用いて測定し、旋光度はアタゴ社製AP-300を用いて測定した。

化合物 2 の合成

化合物 1 (1.00 g, 4.64 mmol) を 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (14 mL) に溶解し、室温にてクロロギ酸 2, 2, 2-トリクロロエチル (2.0 mL, 14.5 mmol) を加え、室温にて 24 時間攪拌した。反応終了後、凍結乾燥した。得られた化合物 2 をピリジン (20 mL) に溶解し、0 °C にて無水酢酸 (15 mL) を加え、室温にて 24 時間攪拌した。反応終了後、0 °C にてメタノール (5.0 mL) を加えて過剰の試薬を分解し、減圧濃縮した。得られたシラップをクロロホルムで抽出し、2 N-HCl、H₂O の順に洗浄した。Na₂SO₄ にて乾燥後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Fuji Silysia 80 mesh, ℓ = 18 cm) に供し、溶出液 (1:3 AcOEt-hexane) にて化合物 2 (2.37 g, 98.3 %) を $\alpha\beta$ 体混合物として得た。

化合物 3 の合成

化合物 2 (724 mg, 1.39 mmol) をジクロロメタン (4.2 mL) に溶解し、室温にてベンジルアルコール (305 μ L, 2.94 mmol)、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (507 μ L, 4.0 mmol) を加え、室温にて 5 時間攪拌した。反応終了後、クロロホルムで抽出し、Na₂CO₃ 水溶液にて洗浄した。Na₂SO₄ にて乾燥後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルクロマトグラフィー (Fuji Silysia 300 mesh, ℓ = 18.5 cm) に供し、溶出液 (1:4 AcOEt-hexane) にて化合物 3 (304.2 mg, 38.5 %) を得た。なお副生成物の β 体は (232.2 mg, 29.4 %) であった。

$[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -69.15^\circ$ ($c = 3.04$, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.35–7.29 (m, 5 H, Ph), 5.41 (d, 1 H, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-4), 5.16 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.6$, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-3), 5.05 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 4.94 (d, 1 H, Ph-CH), 4.72 (s, 2 H), 4.24–4.13 (m, 2 H, H-2 and H-5), 2.17, 2.08, 2.00 (3 s, 9 H, AcO).

化合物 4 の合成

化合物 3 (232.2 mg, 0.41 mmol) を酢酸 (5.0 mL) に溶解し、室温にて亜鉛粉末 (700 mg, 10.7 mmol) を加え、60 °C にて 3 時間攪拌した。反応終了後、セライトろ過し、クロロホルムで洗浄した。そのろ液と洗液を合わせ減圧濃縮し、真空ポンプにて 3 時間乾燥させた。得られた残渣をメタノール (3.0 mL) に溶解し、0 °C にて無水酢酸 (1.2 mL) を加え、室温にて 5 時間攪拌した。次いで、ピリジン (0.4 mL) を加え 1 時間攪拌した。反応終了後、減圧濃縮して得られたシラップをクロロホルムにて抽出し、2 N-HCl にて洗浄した。Na₂SO₄ にて乾燥後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルクロマトグラフィー (Fuji Silysia 300 mesh, ℓ = 11 cm) に供し、溶出液 (80:1 CHCl₃-

MeOH) にて化合物 4 (164 mg, 92 %) を得た。

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.49–7.36 (m, 5 H, Ph), 6.02 (br-d, 1 H, NH), 5.38–5.34 (m), 4.76 (m, 1 H), 4.47 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 2.4$, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, H-2), 4.36 (dd, 1 H, H-6), 4.22–4.18 (m, 2 H, H-6' and H-5), 2.14, 2.08, 2.05 (3 s, 9 H, AcO), 1.99 (s, 3 H, AcN).

化合物 5 の合成

化合物 4 (16.3 mg, 0.037 mmol) をメタノール (2.0 mL) に溶解し、室温にて触媒量のナトリウムチラートを加え、室温にて 1 日攪拌した。反応終了後、Dowex (H⁺) にて中和し、メタノールで洗浄した。それを減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex LH-20, ℓ = 32 cm) に供し、溶出液 (MeOH) にて化合物 5 (12 mg, quant.) を得た。

$[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -67.40^\circ$ ($c = 0.36$, CH₃OH); ¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.35–7.23 (m, 5 H, Ph), 4.89 (d, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1), 4.72 (d, 1 H, Ph-CH), 4.50 (d, 1 H, Ph-CH), 4.21 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 2.0$, $J_{2,3} = 7.3$ Hz, H-2), 4.05 (dd, 1 H, H-6), 3.98 (dd, 1 H, H-6'), 3.72 (m, 1 H, H-5), 1.93 (s, 3 H, AcN).

化合物 10 の合成

N, N-ジメチルホルムアミドに溶解した化合物 5 (10 mM: 17 μ L, 0.17 μ mol) と AcONa b. f. (50 mM, pH = 5.6) に溶解した化合物 9 (38 mM: 9 μ L, 0.34 μ mol) 混合し、AcONa b. f. (50 mM, pH = 5.6, 27 μ L) を加え、最後に β -ガラクトシダーゼ (0.3 U) を加え、37 °C にて 1 時間インキュベートした。反応終了後、100 °C にて 5 分間加熱し、遠心分離操作 (5000 r.p.m. \times 10 min) を行い、上澄みを HPLC へ供し目的とした化合物 10 を得た。

HPLC (ODS-100V column): $t_{\text{R}} = 10.44$ min.

ESI-MS Calcd: C₂₁H₃₁NO₁₁ 473.47, found: 496.25 (M+Na)⁺.

謝辞

本研究は若手研究 (B) No. 21710230 の助成を受けて行った。

参考文献

1. Ding, D. H.; Vera, J. C.; Heaney, M. L.; Golde, D. W. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24580.
2. Branza, N. N.; Negroiu, G.; Petrescu, A. J.; Garman, E. F.; Platt, F. M.; Wormald, M.; R.; Dwek, R. A.; Petrescu, S. M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8169.
3. Zhong, X.; Malhotra, R.; Woodruff, R.; Guidotti, G. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 41518.

4. Robert, L.; Shields, J, L.; Rodney, K.; Lori, Y.; O'Connell, K, H, Y.; Gloria, M.; Stefanie, H.; Weikert, A.; Leonard, G, P. (2002) .*J. Biol. Chem.* , **277**, 26733.
5. Hakomori, S. (1984) .*Ann. Rev. Immunol.* **14**, 1132.
6. Feizi, T.; Childs, R, A. (1985) .*Trens biochem. Sci.* **10**, 24.
7. Speonger, G, F. (1984) .*Science*. **224**, 1198.
8. Fung, P, Y, S.; Madej, M.; Koganty, R, R.; Longenecker, B, M. (1990) .*Cancer Res.* **50**, 4308.
9. Koganty, R, R.; Reddish, M. A.; Longenecker, B, M. (1996) . *Drug discovery Today* . **1**, 190.
10. Dziadek, S.; Kunz, H. (2004) . *The Chemical Record* . **3**, 308.
11. Brocke, C.; Kunz, H. (2002) .*Bioorg. Med. Chem.* **2**, 3085.
12. Braun, P.; Davies, G, M.; Price, M, R.; Williams, P, M.; Tendler, J.; Kunz, H. (1998) .*Biorg. Med. Chem.* **6**, 1531.
13. Live, D, H.; Williams, L, J.; Kuduk, S, D.; Schwarz, J, B.; Glunz, P, E.; Chen, X, T.; Sames, D.; Kumar, R, A.; Danishefsky, S, J. (1999) .*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 3489.
14. Usui, T.; Kubota, S.; Ohi, H. (1993) . *Carbohydr. Res.* **244**, 315.
15. Yamaguchi, M.; Urano, A.; Kawashima, Y.; Kimura, N.; Kanda, W. (2011) .*Bull. Fac. Ed. Wakayama Univ. Natur. Sci.* **61**, 1.